

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ МИКРОБНЫХ АУТОВАКЦИН В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Гос. учреждение «Ин-т отоларингологии им. проф. А.И. Коломийченко
АМН Украины», Харьк. гос. мед. ун-т МЗ Украины

Использование микробных вакцин общего назначения, как и индивидуально приготовленных для профилактики различных инфекционно-воспалительных процессов в верхних дыхательных путях, показало целесообразность их назначения в комплексном лечении лиц с воспалительными заболеваниями данной локализации.

Так, отмечена клиническая эффективность вакцинирующих препаратов, полученных из микроорганизмов, которые высеяны из верхних дыхательных путей при полипозных риносинуситах, а также повышение некоторых иммунологических показателей местного (иммуноглобулины класса А и G в слюне) и системного характера (содержание иммуноглобулинов в сыворотке и Т и В лимфоцитов в крови) (В.Ф. Филатов и соавт., 2001; С.В. Филатов, 2003; А.В. Лупырь и соавт., 2005). В экспериментальных условиях выявлено, что микробные вакцины, полученные различными способами от больных хроническим полипозным риносинуситом, обладают выраженным иммуномодулирующим действием на факторы врожденного и адаптивного иммунитета при их парентеральном введении (О.Ф. Мельников и соавт., 2005).

Целью работы было сравнение иммуномодулирующей активности *in vitro* двух аутовакцинных препаратов, полученных из микроорганизмов, наиболее часто вегетирующих на слизистой оболочке верхних дыхательных путей у больных хроническим полипозным риносинуситом.

Материал и методы исследований

Исследования выполнены на клетках нёбных миндалин у больных хроническим тонзиллитом, у которых по показаниям бы-

ла произведена тонзиллэктомия. Получение клеток, условия их хранения и культивирования описаны нами ранее (О.Ф. Мельников, 1981; О.Ф. Мельников, Т.А. Заяц, 1999).

Использовались две микробные вакцины, приготовленные различными методами. Первый препарат представлял собой лизат 20 микроорганизмов (ЛМ20) с содержанием 0,7 мг /мл белка, второй – формол-прогретую вакцину из агаровых культур (ФПВ) 6 микроорганизмов с содержанием белка – 0,09 мг/мл. Общими для обеих вакцин и превалирующими были следующие группы микроорганизмов – гемолитического стрептококка, золотистого стафилококка и клебсиеллы.

К отдельным порциям клеток миндалин – по 1 млн в 1 мл среды RPMI-1640 (Serva) добавлялись различные разведения препаратов и инкубировались в течение 2 ч при 37⁰С. После инкубации взвеси дважды отмывались центрифугированием при 105 g и вновь взвешивались в питательной среде. Исходная взвесь (контроль) проходила все этапы манипуляций с клетками, как и опытные образцы, но не контактировала с препаратом.

В исходной взвеси и после обработки различными концентрациями препаратов изучалось содержание лимфоцитов с фенотипом клетки по CD – относительное содержание Т-хелперов (CD₄), В-лимфоцитов (CD₂₀), активированных клеток (CD₂₅), естественных клеток-киллеров (CD₅₆). Функциональная активность клеток оценивалась по уровню естественной клеточной цитотоксичности (ЕЦК) и активности фагоцитоза на стадии захвата частиц латекса.

Экспрессия CD-антигенов изучена методом розеткообразования с использованием консервированных эритроцитов, связанных с различными моноклональными антителами (Витебск, Беларусь). Деструктивная активность ЕЦК исследовалась в отношении ксеногенных мишеней (эритроциты кур), и степень их разрушения определялась спектрофотометрически по выходу гемоглобина (О.Ф. Мельников, Т.А. Заяц, 1999). Фагоцитарная активность оценивалась по относительному числу клеток, захвативших частицы латекса (И.П. Кайдашев, 2003), и выражалась в процентах.

Кроме того, исследовалось влияние аутовакцин на антителообразование в культуре клеток. Аутовакцины вносились в культуру клеток нёбных миндалин с концентрацией 2 млн клеток на 1 мл среды RPMI-1640 (обогащенной L-глутамином – 250 мкг/мл, 2% эмбриональной телячьей сывороткой, ципринолом – 40 мкг/мл) (все реактивы – Serva, Германия) по 10 мкг на флакон, инкубировались при 37⁰С в течение 3 суток. Ежедневно из культуральной смеси отбиралась часть клеток, которые окраши-

вались люминесцентной сывороткой против иммуноглобулинов класса G (реактивы фирмы Медгамал НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, РФ). Препараты изготавливались в соответствии с рекомендациями по работе с флюоресцирующими биопрепаратами (Kubitza, 1968), рассматривались в люминесцентном микроскопе Люмам-М, и подсчитывалось число светящихся клеток на 100 лимфоидных клеток культуральной среды. После 3 суток инкубации в культуральной жидкости определялся уровень антистрептолизина-О с помощью микрометода (О.Ф. Мельников, 1981). Статистический анализ проведен с использованием метода углового преобразования по Фишеру (Е.В. Гублер, 1978).

Результаты исследований

Анализ по средним тенденциям показал, что препараты оказывали влияние на фагоцитарную активность и стимулировали ее в интервале разведений от 10 до 50 мкг/мл по белку (табл. 1). В больших концентрациях не было выявлено какого-либо воздействия на активность фагоцитов среди клеток нёбных миндалин.

Таблица 1

Влияние концентрации белка аутовакцин на фагоцитарную активность клеток миндалин *in vitro*

Изучаемые показатели	Концентрации препаратов, мкг/мл					
	ЛМ ₂₀			ФПВ		
	10	50	100	10	50	100
ФП	55,5	68,8*	54,5	58,2	64,3	50,3
ФИ	4,5	6,6*	7,2*	3,5	5,4*	3,3
Исходный	ФП – 48 (33-70)			ФИ – 3,2 (2- 5)		

При исследовании вектора изменений по препаратам в отдельных сериях разведений обнаружено, что достоверное число повышений отдельных уровней фагоцитарной активности отмечено при использовании препарата ЛМ₂₀. Его стимулирующее влияние на активность фагоцитоза по фагоцитарному индексу проявлялось в более широком диапазоне концентраций, чем формолпрогретой вакцины (рис. 1). Исследование влияния препарата на активность естественных

цитотоксических клеток нёбных миндалин у больных хроническим тонзиллитом также выявило (рис. 2) двукратное достоверное их повышение при действии препарата ЛМ₂₀ только в концентрации 20 мкг/мл (12,2% – в исходном состоянии и 24,6% – под влиянием препарата), вектор влияния ФПВ тоже был направлен в сторону увеличения активности ЕЦК миндалин, однако средние значения цитолитической активности при этом выглядели недостоверными.

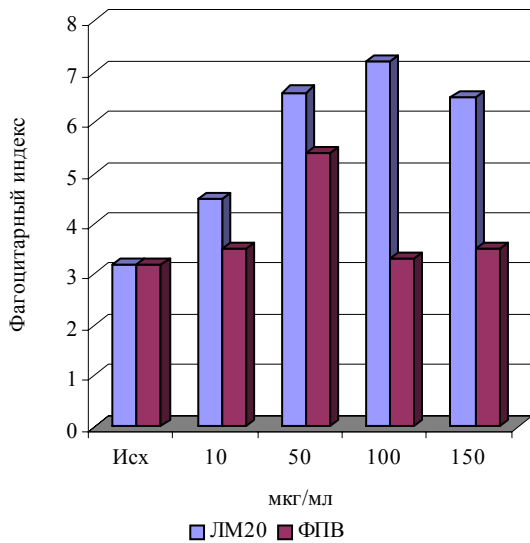


Рис. 1. Влияние препаратов аутовакцин на активность фагоцитоза клетками миндалин у больных хроническим тонзиллитом *in vitro*.

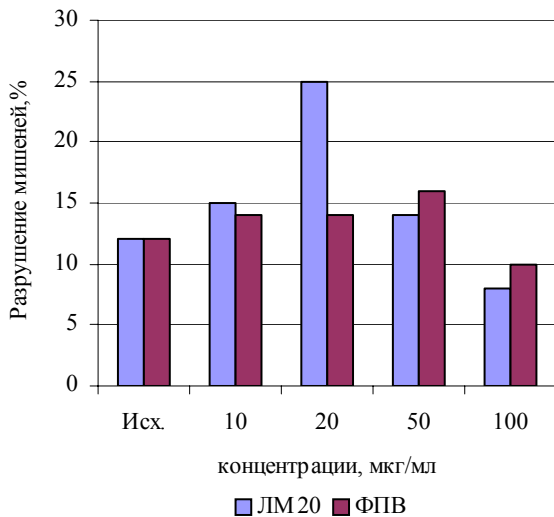


Рис. 2. Влияние аутовакцин в различных разведениях на уровень цитолитической активности клеток миндалин *in vitro*.

Действие аутовакцин на экспрессию CD-антигенов 4, 20, 25 и 56 на клетках миндалин позволило установить (табл. 2) достоверное влияние препарата ЛМ₂₀ и ФПВ в разведении 10 мкг/мл на усиление экспрессии на клетках CD₅₆-антигена, являющегося одним из основных маркеров естественных киллеров (Л.В. Ковальчук, 2003).

Число клеток с фенотипом CD25 также увеличивалось под действием препарата ЛМ₂₀ в конечных разведениях от 10 до 50 мкг/мл, тогда как под влиянием формол-прогретой вакцины это происходило только при концентрации белка 10 мкг/мл. Изме-

нений экспрессии на клетках миндалин других CD-антигенов под действием аутовакцин не выявлено.

Как известно, клетки с фенотипом CD56 и ЕЦК обладают широким спектром противовирусного действия и, наряду с фагоцитирующими клетками, относятся к факторам врожденного иммунитета, которые являются быстрореагирующим звеном в системе иммунной защиты и мало подвержены количественным и функциональным колебаниям в онтогенезе (К.П. Зак и соавт., 1992). Проведенные исследования позволяют полагать, что иммуномодулирующая активность аутовакцин может быть связана, в основном, с влиянием белково-полисахаридных комплексов препаратов на филогенетически древние клеточные механизмы неспецифической защиты. Естественные цитотоксические клетки (NK и К-киллеры) и фагоциты, обеспечивающие эти клеточные механизмы, в значительной степени формируют противоопухолевую и антивирусную резистентность организма (Р.И. Сепиашвили, И.П. Балмасова, 2005; Ortadlo et al., 1991).

Изучение влияния препаратов микробных аутовакцин на вторичный гуморальный иммунный ответ в культуре клеток показало, что (табл. 3) оба они стимулировали антителогенез в культуре. Количество клеток, продуцирующих иммуноглобулины класса G, увеличилось в 1,5 раза по сравнению с контролем и в 2 раза – по сравнению с исходным числом антителопродуцентов. Стимуляция клеток небных миндалин микробными антигенами приводила и к увеличению образования антител к одному из антигенов гемолитического стрептококка – стрептолизину-О (рис. 3). Средний титр антистрептолизина в культуре клеток был равен «0»; при культивировании без антигена – 1, 2, 5; при культивировании с микробными вакцинами средние показатели составили для ЛМ₂₀ – 1:4, для ФПВ – 1:5,4. Увеличение числа клеток-антителопродуцентов IgG в первые сутки культивирования существенно не отличалось от исходного, равно как и содержание антител к стрептолизину. Достоверное повышение числа этих клеток на 3-и сутки культивирования происходило как под влиянием лизатов микробов (вакцина ЛМ₂₀), так и при действии формолпрогретых микробных взвесей (вакци-

на (ФПВ), однако при использовании ФПВ динамика нарастания и уровень антител в культуре были выше, чем при применении ЛМ₂₀, что, по всей вероятности, свидетельст-

вует о том, что ФПВ-вакцина оказывает более выраженный стимулирующий эффект на клетки иммунологической памяти в отношении антигенов гемолитического стрептококка.

Таблица 2

Влияние различных концентраций белка аутовакцин на экспрессию CD-антигенов на клетках миндалин у больных хроническим тонзиллитом при совместной инкубации *in vitro*

Изучаемые CD-антигены	Относительное содержание клеток, %							
	ЛМ ₂₀ , мкг/мл				ФПВ, мкг/мл			
	10	20	50	100	10	20	50	100
CD ₄	31,4	33,3	24,7	25,5	27,8	33,7	38,3	24,5
CD ₂₀	10,5	13,8	15,2	12,5	12,5	11,6	12,5	11,8
CD ₂₅	24,6*	28,8*	26,5*	11,5	24,8*	16,2	10,6	11,8
CD ₅₆	28,8*	16,6	15,8	14,5	17,7	18,5	16,6	15,5

Доноры: CD₄ – 30,2%; CD₂₀ – 11,5%; CD₂₅ – 12,4%; CD₅₆ – 19,6%.

Таблица 3

Число клеток-антителопродуцентов и уровень антистрептолизина-О в культуре клеток небных миндалин на 3-и сутки культивирования с микробными вакцинами

Изучаемые группы	Число наблюдений	Относительное число люминесцирующих клеток, %	Средний титр антистрептолизина-О в культуральной жидкости
Исходный	11	7,2 (3-12)	0
Контроль (культивирование без препаратов)	12	8,3 (6-12)	1:2,5 (0- 1:4)
ЛМ 20	12	14,3 (10-18)*	1:4
ФПВ	12	18,5 (11-23)*	1:5,4 (1:2-1:8)*

Примечание: * - достоверно по отношению к контролю (p < 0,05)

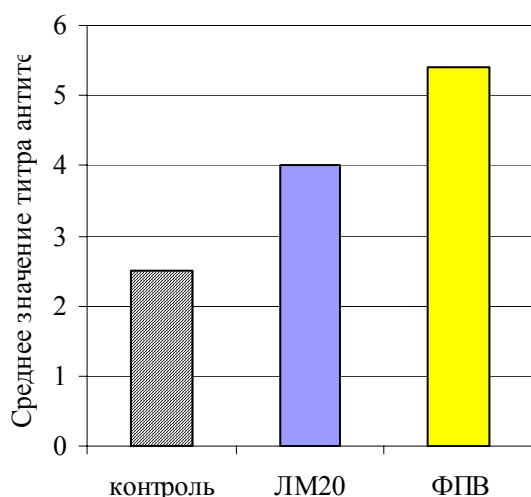


Рис. 3. Титры антител к стрептолизину-О в культуральной жидкости на 3-и сутки от начала инкубации клеток небных миндалин у больных хроническим тонзиллитом с различными микробными вакцинами; желтым цветом выделена достоверность различий по отношению к контролю.

Таким образом, исследования, проведенные *in vitro* по определению воздействия микробных аутовакцин от больных хроническим полипозным риносинуситом на клетки небных миндалин человека, свидетельствуют о выраженном иммуномодулирующем их влиянии на фенотипические и функциональные свойства аллогенных тканевых лимфоцитов небных миндалин. Формол-прогретая вакцина в большей степени, чем лизат микроорганизмов, стимулировала антителопродукцию. Вектор влияния зависел от концентрации антигенов, контактирующих с иммунокомпетентными клетками: небольшие концентрации, как правило, вызвали стимулирующее действие, большие – индифферентное, что свидетельствует об отсутствии выраженного угнетающего воздействия антигенов микробных вакцин на клетки иммунитета.

1. Гублер Е.В. математические методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, 1978. – 294 с.
2. Зак К.П., Киндзедьский Л.П., Бутенко А.К. Большие гранулосодержащие лимфоциты в патологии. – К.: Наук. думка. – 1992, 164 с.
3. Ковальчук Л.В. Антигенные маркеры иммунной системы человека: Уч. пособие. – М., 2003. – 75 с.
4. Лупырь А.В., Заболотный Д.И., Мельников О.Ф. Гуморальные факторы иммунитета секрета из ротовой части глотки у больных полипозным риносинуситом при различных схемах послеоперационного лечения // Ринологія. – 2005. – №4. – С. 42-45.
5. Мельников О.Ф. Иммунологические аспекты генеза хронического тонзиллита и регуляции функциональной активности небных миндалин: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Киев, 1981. – 42 с.
6. Мельников О.Ф., Заяц Т.А. Сравнительное изучение радиоизотопного и спектрофотометрического метода изучения цитолиза клеток // Лаб. диагностика. – 1999. – №5. – С. 43-45.
7. Мельников О.Ф., Заболотный Д.И., Лупырь А.В. Сравнительная оценка клеточных и гуморальных реакций иммунитета у экспериментальных животных при системной иммунизации различными микробными вакцинами // Ринологія. – 2005. – №1. – С. 18-22.
8. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиологические основы функционирования новой субпопуляции лимфоцитов – ЕКТ // Алергологія и иммунологія. – 2005. – Т.6, №1. – С. 14-19.
9. Филатов С.В. Некоторые аспекты патогенетического воздействия аутовакцинолечения при полипозе носа // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2003. – №3. – С. 225.
10. Филатов В.Ф., Калашник М.В., Филатов С.В., Е.М. Бабич, Ященко М.И. Использование аутовакцины как способ повышения эффективности лечения больных полипозным этмоидитом // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2001. – №1. – С. 8-12.
11. Kubitza Y. Иммунофлюоресценция. – М.: Мир (пер. польск.), 1968. – 128 с.
12. Orthadlo J.R., Winkler-Pickett R.T., Yagita H. Comparative studies of CD3- & CD3+CD56+ cells: examination of morphology, function, N-receptor rearrangement and pore forming protein expression // Cell. Immunol. – 1991. – Vol.136. – P. 486-495.

Поступила в редакцию 28.08.07.

© Д.И. Заболотный, А.В. Лупырь, О.Ф. Мельников, О.Г. Рылская, 2007

ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОМОДУЛЮЮЧИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МІКРОБНИХ АУТОВАКЦИН В УМОВАХ IN VITRO

*Заболотний Д.І., Лупиць О.В., Мельников О.Ф.,
Рильська О.Г. (Київ, Харків)*

Резюме

Проведено дослідження in vitro впливу мікробних аутовакцин отриманих від хворих на хронічний поліпозний риносинусит на клітини піднебінних мигдаликів людини. Отримані результати свідчать про виражену імуномодулюючу дію мікробних аутовакцин на фенотипі та функціональні властивості тканинних лімфоцитів піднебінних мигдаликів. Формолпрогріта вакцина в більшій мірі, ніж лізат мікроорганізмів, стимулювала антитілопродукцію. Не виявлено пригнічуючої дії антигенів мікробних вакцин на клітини імунітету.

INVESTIGATION OF THE IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF THE MICROBE AUTOVACCINES IN THE CONDITIONS OF IN VITRO

*Zabolotnyy D.I., Lupyr O.V., Melnikov O.F.,
Rylska O.G. (Kyjiv, Kharkiv)*

Resumé

There were conducted the investigation in vitro of the microbe autovaccines influence in patients with chronic polypous rhinosinusitis on cells of human underpalatine tonsils. Received data witnessed about the expressed immunomodulatory action of the microbe autovaccines on the phenotype and functional characteristics of the tissue lymphocytes of the underpalatine tonsils. Hot formulated vaccine more stimulated antibodies production than the microorganism lysate. The depressed action of the vaccine microbe antigens on the immune cells was not defined.